

Application de la technique micro 2D PAGE au microgreffage de *Sequoiadendron giganteum* Buchholz

Marie-Claude BON et Olivier MONTEUUIS

Résumé — Une nouvelle technique de microanalyse par électrophorèse bidimensionnelle, appliquée à des points végétatifs de séquoias géants centenaires greffés *in vitro* sur de jeunes semis, a permis d'observer le profil protéique du méristème terminal de greffons de type morphologique juvénile et mature. Les formes matures se différencient des formes morphologiquement rajeunies par une densité protéique plus importante, notamment du point de vue des protéines acides. Une interprétation de ces résultats est proposée, en envisageant les perspectives offertes par ce type d'analyse pour une étude physiologique du greffage.

Micro 2D PAGE technique applied to micrografting of *Sequoiadendron giganteum* Buchholz

Abstract — A new microanalytic technique, 2D PAGE, applied to meristems of one hundred-year-old giant sequoias grafted onto young seedlings rootstocks *in vitro*, enables us to observe protein patterns of shoot apical meristem corresponding to either mature or juvenile scion morphology. The mature types differ from the juvenile ones through more abundant protein population especially from the acid protein view point. An interpretation of these results is proposed looking forwards to the advantages of such a technique to analyse the physiological basics of grafting.

INTRODUCTION. — Le microgreffage *in vitro* d'extrémités végétatives caulinaires présente beaucoup d'attraits, notamment pour l'amélioration phytosanitaire des agrumes ([1], [2]). Cette technique est également appliquée pour faciliter le clonage d'arbres âgés ([3], [4], [5]). Ainsi sur *Sequoiadendron giganteum* Buchholz, la miniaturisation du greffon (200 μ m) favorise la réacquisition rapide des caractéristiques de type juvénile [6] comme la morphologie foliaire, plus ou moins marquées et variables dans le temps en fonction des greffes considérées [7].

L'étude de ces phénomènes nécessite des moyens d'investigation biochimique adaptés aux dimensions très réduites des structures végétatives manipulées, en l'occurrence un méristème. La technique d'électrophorèse 2D PAGE miniaturisée ([8], [9]), récemment mise au point pour ce type d'analyse, a permis d'observer les modifications de la composition protéique associées au microgreffage des points végétatifs de séquoia géant âgé sur de jeunes semis de la même espèce.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Le matériel végétal.* — La technique de microgreffage a été décrite antérieurement ([6], [7]). Les points végétatifs greffés sur de jeunes semis *in vitro* proviennent de plusieurs têtes de clones centenaires, individus n° 03 et n° 15 notamment [10]. Le méristème terminal du greffon est prélevé sous loupe binoculaire et lumière froide, lorsque ce dernier a atteint une taille de 0,5 à 1 mm, permettant l'observation et la caractérisation de la nouvelle morphologie, en distinguant le type juvénile du type mature (fig. 1). Ce méristème, constitué du dôme méristématique et de un ou deux primordiums, est rapidement broyé sur lame de microscope. L'extrait obtenu est resuspendu dans le milieu de lyse de Granier et de Vienne [11].

2D PAGE. — L'isoélectrofocalisation (IEF) est une adaptation du protocole de Zivy et coll. [12]. Vingt μ l d'échantillon ont été déposés sur chaque gel d'IEF de 100 mm de long, 1 mm de diamètre et de composition suivante : 3,78 % d'acrylamide, 0,22 % N-N' méthylène bis-acrylamide, 2 % Triton X-100, 9,2 M urée, 4 % Pharmalytes pH 5-8. Tous les gels subissent la même IEF (4000 V/h) avec une solution cathodique (50 mM NaOH) et anodique (50 mM H₃PO₄) et sont équilibrés 15 mn dans le tampon suivant (62,5 mM Tris pH 6,8; 2,3 % SDS). Ils sont déposés sur des gels de seconde dimension (concentration constante d'acrylamide à 12 %) selon Laemmli [13]. L'électrophorèse est conduite à 150 V pendant 1 h 30 mn et révélée selon la méthode de coloration au nitrate d'argent d'Irie et coll. [14].

Pour chacun des deux types morphologiques bien contrastés du greffon (forme juvénile ou forme mature), quatre électrophorégrammes ont été observés essentiellement sur les clones n°s 03 et 15, d'origine différente et bien représentatifs de l'état mature [10].

Note présentée par Alexis MOYSE.



Fig. 1. — Types morphologiques des greffons observés : morphologie rajeunie à gauche, morphologie mature à droite.

Fig. 1. — Scion morphology observed: left, rejuvenated form; right, mature form.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS. — Les électrophorégrammes en bidimension de protéines de méristèmes correspondant au type morphologique juvénile et mature sont présentés sur la figure 2 pour les clones n^{os} 03 et 15.

Quelle que soit l'identité génétique du clone considéré, néanmoins appréciable à travers les profils électrophorétiques observés [15], les greffons à morphologie mature caractérisée sur la figure 1, se différencient de leurs homologues morphologiquement rajeunis par une population protéique globalement plus dense avec une intensification de la présence de protéines acides. Cette tendance a pu être vérifiée quel que soit l'origine et les particularités du profil protéique initial du méristème, reflétant dans l'ensemble l'hétérogénéité notable rencontrée chez un grand nombre de végétaux ligneux et observée par Cross [16] sur le séquoia géant. Cette variabilité entrave considérablement l'analyse des effets spécifiques du microgreffage sur les points végétatifs greffés.

D'autres facteurs perturbateurs doivent également être considérés, tels que l'état physiologique du porte-greffe *in vitro* au moment du greffage ([7], [17]) et la qualité de l'union de la greffe ([4], [18]). Ces éléments interviennent vraisemblablement dans la variabilité intraclonale du matériel greffé [7].

Néanmoins, les différences de densité de la population protéique observée, correspondant à deux expressions morphologiques bien contrastées, incitent à analyser la dynamique

EXPLICATIONS DE LA FIGURE 2

Fig. 2 A. — Électrophorèse bidimensionnelle d'un méristème issu d'un clone centenaire n° 15 et greffé sur un semis *in vitro*. Le microgreffon présentait une morphologie de type mature.

Fig. 2 A. — Two dimensional electrophoresis of one single meristem removed from one hundred year old clone No. 15 grafted onto young seedling, *in vitro*. Scion morphology was mature form.

Fig. 2 B. — Électrophorèse bidimensionnelle d'un méristème issu d'un clone centenaire n° 15 et greffé sur un semis *in vitro*. Le microgreffon présentait une morphologie de type juvénile.

Fig. 2 B. — Two dimensional electrophoresis of one single meristem removed from one hundred year old clone No. 15 grafted onto young seedling, *in vitro*. Scion morphology was juvenile form.

Fig. 2 C. — Électrophorèse bidimensionnelle d'un méristème issu d'un clone centenaire n° 03 et greffé sur un semis *in vitro*. Le microgreffon présentait une morphologie de type mature.

Fig. 2 C. — Two dimensional electrophoresis of one single meristem removed from one hundred year old clone No. 03 grafted onto young seedling, *in vitro*. Scion morphology was mature form.

Fig. 2 D. — Électrophorèse bidimensionnelle d'un méristème issu d'un clone centenaire n° 03 et greffé sur un semis *in vitro*. Le microgreffon présentait une morphologie de type juvénile.

Fig. 2 D. — Two dimensional electrophoresis of one single meristem removed from one hundred year old clone No. 03 grafted onto young seedling, *in vitro*. Scion morphology was juvenile form.

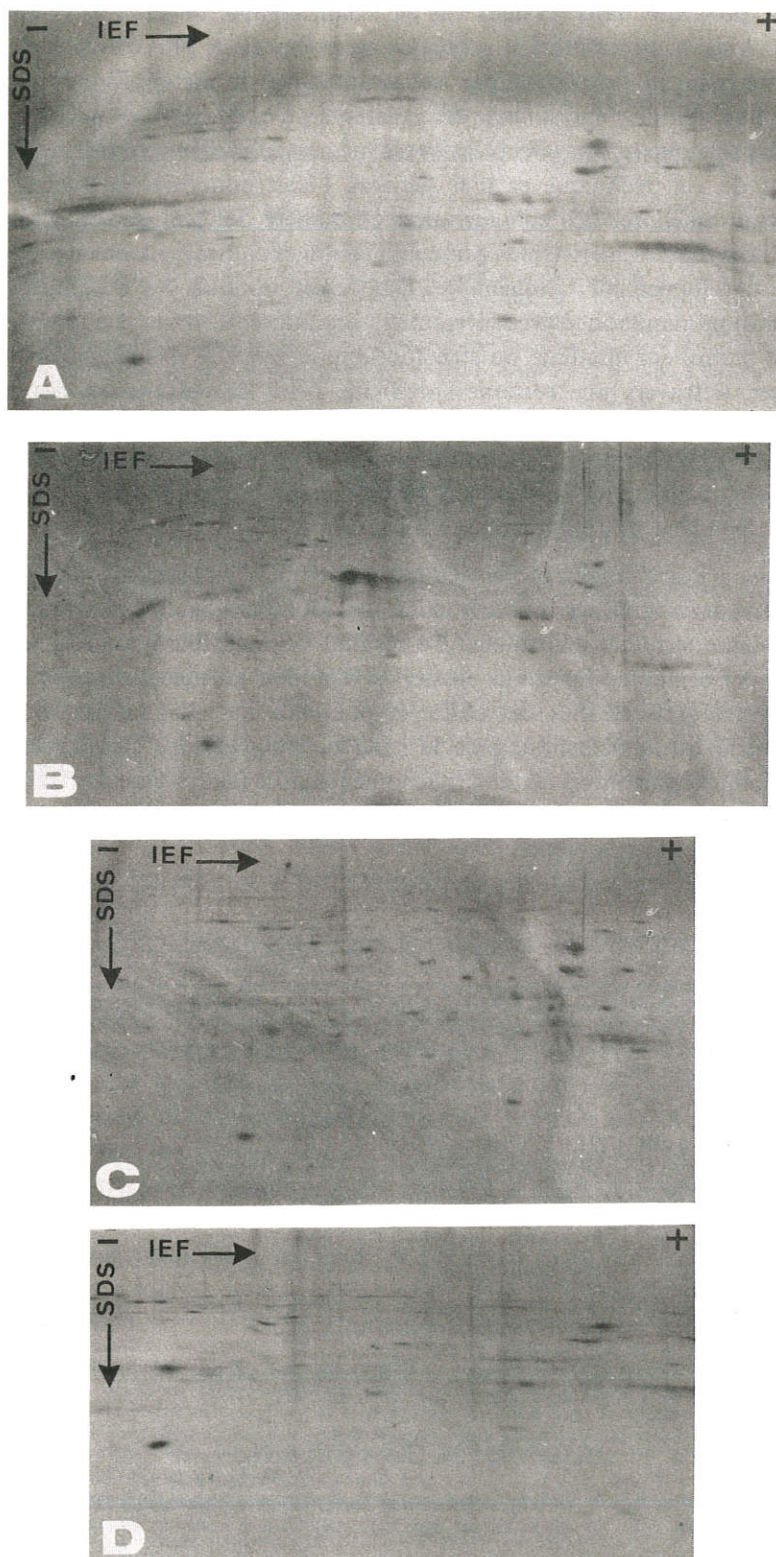


Fig. 2

de la synthèse protéique dans les deux cas en tenant compte du taux de renouvellement des protéines. Ainsi la concentration protéique méristématique plus élevée chez le greffon de type mature pourrait s'expliquer par une adaptabilité du métabolisme protéique plus difficile, face aux stimulus physiologiques inhérents au greffage. Des analyses connexes de la synthèse protéique *in vivo* effectuées sur le même matériel supportent ces hypothèses.

D'un point de vue technique et plus général, l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines devrait améliorer nos connaissances en matière de vieillissement des arbres, en travaillant à l'échelle des méristèmes primaires caulinaires directement impliqués dans le processus de développement ontogénique. Dans cette optique, les protéines du fait de leur concentration tissulaire élevée présentent un intérêt certain. La diversité de ces composés, de nature enzymatique ou structurale, pourrait être mise à profit pour tenter de caractériser, à travers une certaine spécificité, l'état de maturation des méristèmes considérés. Cette option rationnelle apparaît novatrice pour l'étude biochimique des phénomènes de rajeunissement, en constatant que les méthodes d'investigation proposées jusqu'alors dans ce domaine ne sont pas focalisées sur les points végétatifs, à l'origine des réversions de phase morphologiques constatées.

CONCLUSION. — Les analyses présentées montrent que l'expression morphologique du greffon suite au microgreffage, correspond à des modifications de nature protéique au sein du méristème terminal edificateur. Ce résultat original, basé sur une technique de microanalyse performante, illustre la possibilité d'étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans le greffage. Sur ces bases, la poursuite de telles études en privilégiant l'aspect qualitatif de la détection, puis le suivi de polypeptides spécifiques, devraient favoriser la compréhension de certains phénomènes non encore élucidés, tels que l'effet rajeunissant du porte-greffe ([3], [5], [7]).

Note reçue et acceptée le 12 octobre 1987.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. JONARD, I. SOEDHARMA et P. VILLEMUR, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 305, 1987, p. 45-49.
- [2] L. NAVARRO, C. N. ROISTACHER et T. MURASHIGE, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 100, 1975, p. 471-479.
- [3] J. P. MISSON et P. GIOT-WIRGOT, *Annales AFOCEL*, 1984, p. 187-197.
- [4] T. MURASHIGE, W. P. BITTERS, T. S. RANGAN, E. M. NAUER, C. N. ROISTACHER et P. B. HOLLIDAY, *Hortscience*, 7, 1972, p. 118-119.
- [5] H. TRAN VAN et A. DAVID, *Can. J. Bot.*, 63, 1985, p. 1017-1020.
- [6] O. MONTEUUIS, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 302, 1986, p. 223-225.
- [7] O. MONTEUUIS, *Annales AFOCEL*, 1986, p. 39-61.
- [8] G. GAY, C. KERHOAS et C. DUMAS, *Electrophoresis*, 7, 1986, p. 148-149.
- [9] J. E. MAYER, G. HAHNE, K. PALME et J. SCHELL, *Plant Cell Reports*, 6, 1987, p. 77-81.
- [10] O. MONTEUUIS, *Annales AFOCEL*, 1984, p. 139-171.
- [11] F. GRANIER et D. DE VIENNE, *Analyt. Biochem.*, 155, 1986, p. 45-50.
- [12] M. ZIVY, H. THIELLEMENT, D. DE VIENNE et J. P. HOFFMANN, *Theor. Appl. Genet.*, 66, 1983, p. 1-7.
- [13] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680-685.
- [14] S. IRIE, M. SEZAKI et Y. KATO, *Analyt. Biochem.*, 126, 1982, p. 350-354.
- [15] M. C. BON, soumis à publication à *Plant Cell Reports*.
- [16] G. L. GROSS, *Am. J. of Bot.*, 30, 1943, p. 130-142.
- [17] J. L. POESSEL, J. MARTINEZ, J. J. MACHEIX et R. JONARD, *Physiol. vég.*, 18, 1980, p. 665-675.
- [18] T. SHIMOMURA et K. FUZIHARA, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 45, 1977, p. 397-406.

M. C. B. et O. M. : Laboratoire de Phytomorphogenèse U.A. n° 45, C.N.R.S.,
4, rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand Cedex;

O. M. : Association Forêt-Cellulose, domaine de l'Etançon, 77370 Nangis.